

## MARCADORES DE CONGELABILIDADE: PROTEÍNAS E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA À CRIOPRESERVAÇÃO EM DIFERENTES VARRÕES

[Markers of freezability: proteins and their relationship to sperm cryopreservation resistance in different boars]

Ricardo Tonioli<sup>1</sup>, Tatyane Bandeira Barros<sup>2</sup>, Daianny Barboza Guimarães<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen – FAVET/UECE; \*Autor para correspondência: E-mail: tonioli@roadnet.com.br.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE.

**RESUMO** - O uso do sêmen congelado apresenta uma viabilidade à longo prazo, mas este ainda está associado à baixos índices produtivos. O espermatozoide suíno é bastante sensível a congelação. Seu emprego na inseminação artificial está associado à uma redução de 10 a 20% na taxa de parto e de 1 a 2 leitões por leitegada. Assim, todos os fatores que possibilitem a redução de custos e tornem esta fonte energética mais acessível merecem ser estudados. Para isto, a busca por novas alternativas em pesquisas, é de fundamental importância, objetivando maximizar o uso desta nova biotécnica. Com o intuito da viabilização do uso de ejaculados, estudos tem sido realizados com a finalidade de identificar proteínas presentes no sêmen e na membrana espermática que possibilitem a busca por marcadores de congelabilidade de ejaculados de diferentes varrões. Dentro deste contexto, e, considerando a importância da produção de proteína animal na região Nordeste do Brasil, mais especificamente da espécie suína, o intuito do presente trabalho é o de contribuir para que a criopreservação na espécie suína apresente uma maior eficiência e o sêmen pós congelação possa ser utilizado com resultados economicamente viáveis. Desta forma, o desenvolvimento de um novo protocolo de congelação que reduza custos, bem como a identificação de proteínas presentes no plasma seminal e/ou na membrana plasmática que estejam relacionadas com a proteção do espermatozoide ao processo de criopreservação, é de suma importância visando a maximização dos resultados de fertilidade e prolificidade obtidos até o presente momento com o uso do sêmen congelado.

**Palavras-Chave:** sêmen; suíno; conservação; fertilidade; prolificidade.

**ABSTRACT** - The use of frozen semen has a long-term viability, but this is still associated with low production rates. The pig sperm is very sensitive to frost. Its use in artificial insemination is associated with a reduction of 10 to 20% in the delivery rate and 1-2 piglets per litter. Thus, all factors that enable cost reduction and make this more affordable energy source worth studying. For this, the search for new alternatives in research, is a fundamental importance, aiming to maximize the use of this new biotechnology. With the aim of enabling the use of ejaculates, studies have been conducted in order to identify proteins present in semen and sperm membrane that allow the search for markers of freezability ejaculates from different boars. Within this context, and considering the importance of animal protein production in the Northeast of Brazil, specifically swine, the aim of this work is to contribute to that cryopreservation in swine present a more efficient and semen after freezing can be used to economically viable results. Thus, the development of a new freezing protocol that reduces costs as well as the identification of proteins present in seminal plasma and/or the plasma membrane that are related to the protection of the sperm cryopreservation process is of paramount importance with a view to maximizing fertility and prolificacy results obtained so far with the use of frozen semen.

**Keyword:** semen; swine; conservation; fertility; prolificity.

### INTRODUÇÃO

Até o início da década de 70, a criopreservação do sêmen suíno era pouco desenvolvida e resultava sempre na perda da capacidade de fertilização dos espermatozoides (Bortolozzo et al., 2005). A baixa

fertilidade em relação ao sêmen resfriado era o principal, porém não o único fator limitante. Variações no resultado da congelação de sêmen entre cachacos; processamento dispendioso; utilização de um grande número de células por dose; inexistência de testes confiáveis para a

avaliação da viabilidade espermática e momento crítico de inseminação, dentre outros, são pontos que dificultam a expansão e utilização do sêmen congelado em escala comercial (Reed, 1985).

Atualmente, estima-se que sejam realizadas em torno de 19 milhões de inseminações artificiais (IA) com sêmen suíno em todo mundo, sendo que, menos de 1% usam doses criopreservadas (Johnson et al., 2000). A disponibilidade de sêmen congelado trará um grande impulso aos programas de IA, permitindo o acesso de pequenos produtores à machos selecionados, independente da distância que os separa das Centrais de IA.

A utilização extensiva da IA baseia-se na conservação do sêmen resfriado, o qual, apesar de proporcionar resultados de fertilidade semelhantes ou melhores aos da monta natural, limita a aplicação do sêmen a um período de 2 a 3 dias após a coleta (Scheid et al., 1986). Esta limitação poderia ser facilmente superada com o emprego de sêmen congelado, com o intuito de otimizar um protocolo de congelamento na espécie suína (Hess et al., 1960).

Embora esta tecnologia venha sendo aprimorada, os resultados dos métodos de conservação do sêmen suíno são ainda insuficientes, quando comparados ao emprego do sêmen refrigerado (Mileham et al., 1997), no tocante à preservação da fecundidade à níveis que atendam a demanda da produção comercial de leitões (Scheid, 1991).

Vários fatores são apontados como responsáveis pelos baixos resultados de fertilidade com o uso do sêmen suíno congelado. Reconhece-se a sensibilidade do espermatozoide a baixas temperaturas; os crioprotetores habituais para outros sistemas biológicos, tem ação reduzida ou inexistente para o sêmen suíno (Salamon et al., 1973).

Desta forma, a identificação de determinados grupos proteicos presentes no ejaculado pode dar suporte a diversas linhas de pesquisas, particularmente a busca de marcadores de congelabilidade, através da caracterização de proteínas específicas envolvidas na atividade espermática (Collares, 2005), que podem permitir seu uso como marcadores de congelabilidade do sêmen de determinados varrões (Jobim et al., 2004; Moura et al., 2006).

A elevação dos resultados de fertilidade com o uso do sêmen congelado depende da geração de novos conhecimentos em um vasto campo da ciência, que inclui desde áreas como bioquímica e criobiologia, até aspectos aplicados às metodologias de congelamento, à determinação do momento ideal de inseminação.

## REVISÃO LITERATURA

### CARACTERÍSTICAS DO EJACULADO SUÍNO

O ejaculado pode ser dividido em quatro fases distintas, sendo elas a uretral, a rica em espermatozoides, a pobre em espermatozoides e a gelatinosa. A fase das glândulas uretrais consiste pelos primeiros 10 a 15 mL liberados e tem a função de adequar o canal da uretra para a passagem dos espermatozoides, desta forma, essa primeira parte não é aproveitada na coleta. A fase rica, com aspecto variando de leitoso ao leitoso denso, contém cerca de 70% dos espermatozoides do ejaculado. A fase pobre, que apresenta um aspecto soroso, contém o restante das células espermáticas. Essas duas fases do ejaculado são aproveitadas para a análise e posterior conservação do sêmen. Por último, a fase gelatinosa, composta pela secreção das glândulas bulbo-uretrais, retida através do uso de um papel filtro posicionado no copo de coleta e posteriormente descartada (Bortolozzo et al., 2005).

### COMPOSIÇÃO DO EJACULADO

O plasma seminal consiste em um fluido produzido pela rete testis, epidídimo e glândulas acessórias. Ele contém vários componentes de extrema importância para a sobrevivência dos espermatozoides, com papel essencial nas funções espermáticas *in vivo* após a ejaculação até a fertilização (Kraus et al., 2005). A função do plasma, segundo Miller et al. (1990), é servir como um veículo para os espermatozoides ejaculados, e fornecer substratos metabolizáveis para a célula espermática. Ele é um fluido muito complexo, caracterizado por grande conteúdo de água, íons inorgânicos, ácido cítrico, açúcares, sais orgânicos, prostaglandinas e um número variado de proteínas que agem como substâncias tampão, de forma a manter a osmolaridade adequada e um pH próximo do neutro. Proporciona também fontes de energia para o metabolismo tanto aeróbico quanto anaeróbico (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

### CONSERVAÇÃO DO SÊMEN

Uma das principais expectativas de uso da IA em suínos está vinculada ao desenvolvimento de novas técnicas de armazenamento do sêmen (Cameron, 1998), estando o seu êxito relacionado à capacidade do diluente em conservar os espermatozoides em condições adequadas durante a estocagem do sêmen (Woelders, 1992). Nesse sentido entende-se como necessário a realização de estudos efetivos em busca de diluentes que possam preservar as qualidades fecundantes do sêmen diluído por maior período de tempo possível, a fim de otimizar seu

uso, melhorar o manejo e causar menor desgaste aos reprodutores (Paquignon et al., 1987).

A conservação de sêmen por um longo período possibilitando o seu uso posteriormente, representa uma importante ferramenta para criadores que desejam estocar e difundir o potencial genético de seus reprodutores (Cardoso et al., 2005). Para o sucesso deste trabalho, é necessário manter a integridade celular e reduzir a atividade metabólica, com uma diluição em meio adequado além da redução da temperatura (Sánchez, 2003).

### USO DA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

O sêmen suíno tem sido tradicionalmente armazenado em temperaturas entre 15 e 18 °C após a diluição (Laforest e Allard, 1996). Essa temperatura, entretanto, é limitante para seu armazenamento por períodos prolongados, em virtude de não interromper totalmente o metabolismo espermático, ocorrendo acúmulo de metabólitos. Além disso, essa faixa de temperatura não impede a multiplicação bacteriana, a qual influencia na qualidade do ejaculado e limita o período máximo de armazenamento (Weitze, 1995). Desta forma, foi testado o armazenamento do sêmen suíno em temperaturas próximas a 5 °C, podendo ser o mesmo estocado em refrigeradores domésticos (Landsverk, 2000). No entanto, o espermatozoide suíno é sensível a temperaturas inferiores a 15 °C (De Leeuw et al., 1990).

### USO DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

A congelação de ejaculados de cachacos representa apenas 1% do sêmen usado a nível mundial (Saraiva et al., 2005). A criopreservação, por sua vez ainda apresenta o grave problema de reduzir drasticamente a capacidade fertilizante da população espermática. Restrições ao uso do sêmen congelado também se ligam a variação individual de ejaculados de reprodutores que suportam ou não a criopreservação, além do baixo rendimento no tocante ao número de doses produzidas e dos métodos laboriosos de processamento de material espermático para a congelação (Reed, 1985).

Por isso, a nível comercial, apenas as empresas de melhoramento genético usam sêmen congelado para transferência de material genético de alta qualidade entre granjas localizadas em diferentes países. Desta forma, o uso de sêmen congelado de

cachacos permanece restrito à preservação e transporte por longas distâncias de material genético de alto valor (Scheid e Silveira, 2002).

No desenvolvimento de protocolos de congelação do sêmen suíno tem-se que considerar a interação entre a concentração do crioprotetor utilizado e as velocidades de congelação/descongelação (Johnson et al., 2000). Antes da congelação, o sêmen deve ser resfriado entre 37 °C a aproximadamente 25 °C, o que parece não ocasionar danos às células espermáticas quando estas se encontram diluídas em meio adequado (Keith, 1998).

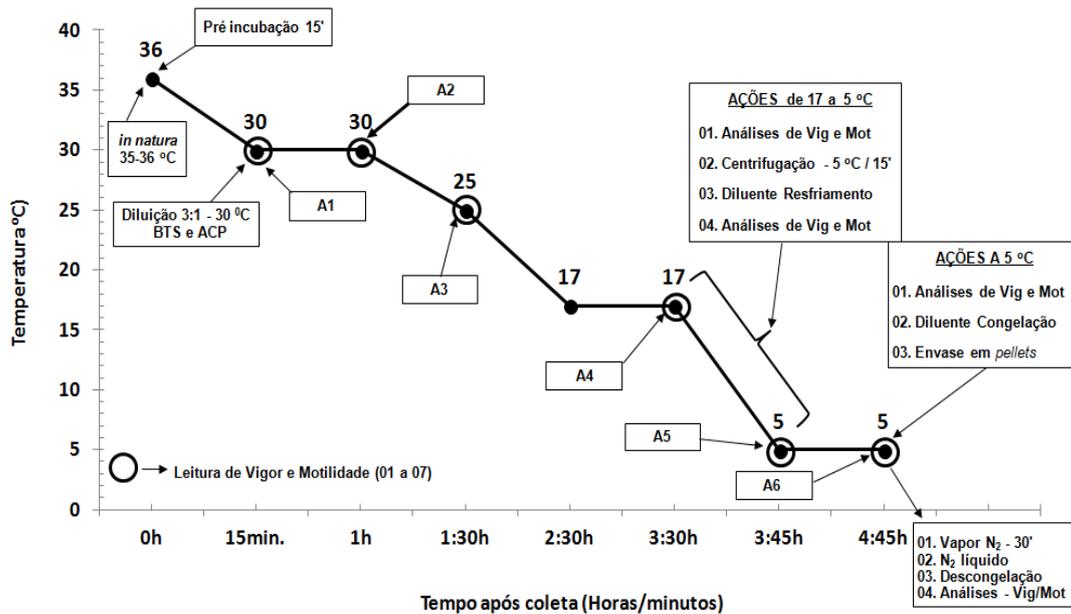
O estresse inicial se dá quando o espermatozoide passa para temperatura próxima a 5 °C (Squires et al., 1999), devido à fase de transição da membrana plasmática, do estado líquido cristalino para o de gel (Medeiros et al., 2002). Este efeito pode ser minimizado pelo controle da taxa de resfriamento, pela adição de protetores celulares (lipídios, gema de ovo, leite) ao diluente (Graham, 1996) além do uso de curvas de resfriamento lentas (Gráfico 1).

Quanto aos padrões seminais desejáveis para sêmen congelado, considera-se fora dos mesmos os ejaculados com motilidade  $\leq 20\%$ , anormalidades espermáticas  $\geq 50\%$  (Corrêa et al., 2001). No entanto, a avaliação *in vitro* da viabilidade espermática pós-descongelação deve ser realizada através de vários exames, visto que testes isolados são insuficientes para identificar ejaculados de baixa congelabilidade (Johnson, 1985). Vários são os testes para verificação *in vitro* da qualidade espermática pós descongelação: motilidade espermática e integridade acrossomal (Paquignon et al., 1980); teste de termorresistência (Tuli et al., 1982).

### PROTEÔMICA DO SÊMEN

A proteômica é uma das principais alternativas para se compreender as interações do plasma seminal com a superfície dos espermatozoides, podendo ser utilizada como um modelo usual para o estudo desta relação (Strzezek et al., 2005). O método mais empregado com alta eficiência na separação e caracterização dos diversos polipeptídeos é a eletroforese. Muitas proteínas do plasma seminal de várias espécies também têm sido analisadas através do SDS-PAGE ou por eletroforese em gel de poliácridamida dimensional (Kowalski et al., 2003; Lahnsteiner et al., 2004).

Gráfico 1. Curva de resfriamento do sêmen, com seus momentos de análises de vigor e motilidade espermática.



## PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL

Dentre as diferentes substâncias que compõem o plasma seminal, as proteínas são os constituintes orgânicos encontrados em maior quantidade. Essas proteínas são importantes fisiologicamente para o sêmen e estão presentes na forma de complexos associados, com composição, conformação e tamanho específico para cada espécie (Jelínková et al., 2003). O plasma possui também substâncias enzimáticas e não enzimáticas que apresentam função antioxidante, dentre eles podem ser citadas a vitamina E, a vitamina C, o urato e a albumina (Baumber et al., 2000; Almeida e Ball, 2005).

As proteínas associadas ao plasma seminal, identificadas no fluido das glândulas anexas tem a capacidade de interagir com os espermatozoides quando da ejaculação. Isto aumenta a possibilidade de algumas dessas proteínas permanecerem associadas a ele, influenciando eventos que ocorrem no trato reprodutivo da fêmea, associado ao transporte espermático, capacitação e fertilização (Moura et al., 2007).

## PROTEÍNAS DA MEMBRANA PLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE

O evento da fertilização nos mamíferos inclui interações bioquímicas altamente reguladas, tais como: ligação de proteínas seminais na superfície dos espermatozoides após a ejaculação; interação de proteínas da membrana espermática com células do oviduto; capacitação espermática; reação acrossômica; reconhecimento, ligação e penetração do espermatozoide na zona pelúcida e posterior

fusão dos gametas (Jansen et al., 2001; Strzezek et al., 2005).

A membrana plasmática pode sofrer remodelações quando o espermatozoide interage com proteínas do plasma seminal durante a ejaculação, com 2 tipos de interações proteicas envolvidos nesse processo: de proteínas com a membrana espermática e mútuas entre proteínas de formas monoméricas (Manásková et al., 2003). A membrana espermática apresenta uma composição mista de fosfolípidios que difere de espécie para espécie, além da temperatura de transição de fase ser variável para cada tipo de fosfolípido (Buhr et al., 1994).

Durante o resfriamento visando a conservação do ejaculado, a separação lateral de fases pode ocorrer e as proteínas podem ficar agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais dos lipídios gelificados, permanecendo em locais onde há lipídios ainda em estado líquido. Pelo fato das proteínas da membrana estarem localizadas em ambiente lipídico não fisiológico, a função das mesmas, importante para a integridade estrutural e/ou funcionamento das bombas de íons, pode ser afetada (Woelders, 1997; Levis, 2000).

Em função da separação de fases, há um aumento da permeabilidade da membrana com perda de cátions e enzimas, redução da atividade enzimática e perturbações nos processos de difusão controlados pela membrana (De Leeuw et al., 1990). Durante o resfriamento, o desequilíbrio iônico intra e extracelular podem reduzir a motilidade espermática (Watson, 1996). Nas temperaturas entre 25 a 5 °C, ocorre a redução da fluidez dos

lipídios da membrana no espermatozoide suíno, o que pode explicar sua maior sensibilidade ao resfriamento (Buhr et al., 1994). Um componente importante que participa da integridade da membrana plasmática é o colesterol. A relação colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide suíno é mais baixa (0,12), podendo ser outro fator responsável pela sua maior sensibilidade a baixas temperaturas (De Leeuw et al., 1990).

### JUSTIFICATIVA

O aumento frequente do uso de programas de IA em granjas comerciais de suínos, exige cada vez mais uma melhora e um desenvolvimento de técnicas mais aprimoradas que possibilite um aumento na produção dessas granjas. Com isso, se faz necessário o aperfeiçoamento de biotécnicas nas unidades de reprodução, que possam ser utilizadas como ferramentas para a otimização da utilização da inseminação artificial (Corrêa et al., 2001).

A conservação de sêmen suíno e sua posterior utilização na IA, se faz através de seu resfriamento, com viabilidade limitada em até três dias. Para proporcionar um período mais prolongado, se faz necessário o uso do sêmen congelado (Hess et al., 1960). No entanto, a congelação do sêmen ainda está associada a baixos índices produtivos e reprodutivos, quando relacionada com os valores obtidos com o uso de sêmen resfriado (Woelders, 1997).

Machos pertencentes à mesma espécie apresentam diferenças em relação aos resultados de fertilidade com sêmen resfriado e com sêmen congelado. Este problema é particularmente observado na espécie suína, onde o cachaço com fertilidade normal em monta natural ou IA com sêmen *in natura* pode apresentar espermatozoides inviáveis após o processo de refrigeração e congelação (Larson et al., 1976).

O espermatozoide suíno é bastante sensível ao processo de congelação. Seu emprego na IA está associado à uma redução de até 30% na taxa de parto e de 1 a 3 leitões por leitegada; a um menor número de doses por ejaculado, o que aumenta os custos por dose produzida (Bortolozzo et al., 2005). Restrições ao uso do sêmen congelado apresentam-se também através da variação individual de ejaculados à congelabilidade; ao baixo rendimento no número de doses e métodos laboriosos de processamento visando a criopreservação (Larsson e Einarsson, 1976). As características particulares que permitem alguns ejaculados a resistirem ao processo de criopreservação melhor do que outros, permanecem sem serem identificadas (Casas et al., 2010).

A congelabilidade do sêmen suíno parece ser mais dependente de características individuais do que do processo de criopreservação em si (Medrano et al., 2009). Trabalhos anteriores têm relacionado este aspecto com a origem genética de suínos (Thurston et al., 2002; Roca et al., 2006), o que também explica o porque que ejaculados coletados do mesmo animal tendem a apresentar os mesmos resultados para a congelabilidade (Rath et al., 2009).

As secreções provenientes das glândulas acessórias são misturadas aos espermatozoides na ejaculação e contribuem com a maior parte do volume seminal. Algumas proteínas das glândulas sexuais acessórias são conhecidas por ligar-se a membrana da célula espermática, afetando suas funções e propriedades (Yanagimachi, 1994). O uso da técnica proteômica na identificação destas proteínas tem sido utilizada para determinar as possíveis relações existentes entre sua expressão e taxas de fertilidade (Moura et al., 2007), mas não há nada descrito para a espécie suína. Como fonte inovadora para a viabilização do uso de sêmen congelado, estudos tem sido realizados a fim de identificar proteínas presentes no sêmen que possibilite a busca por marcadores de congelabilidade através da caracterização de proteínas específicas envolvidas na atividade espermática (Collares, 2005).

### RESULTADOS PRELIMINARES

#### EFEITO DA NOVA CURVA DE RESFRIAMENTO SOBRE A CÉLULA ESPERMÁTICA

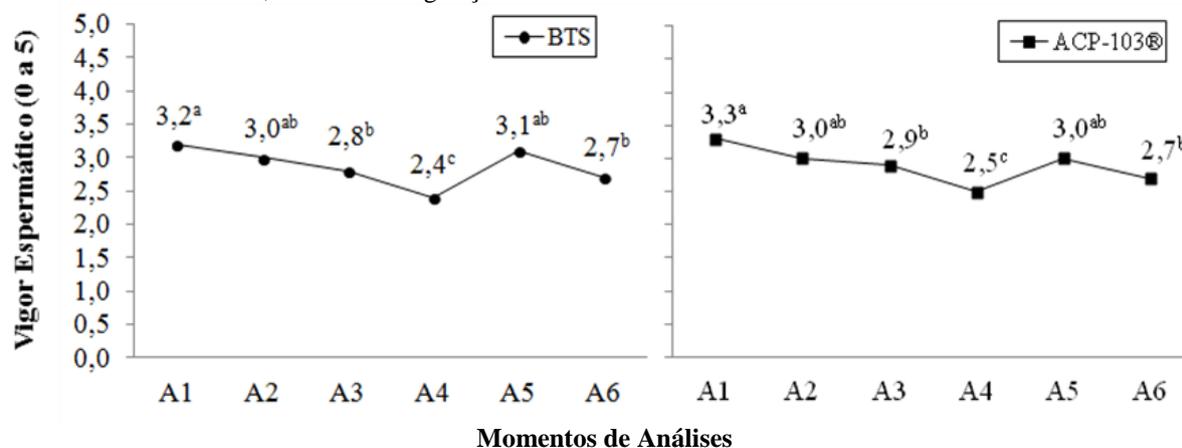
O vigor e a motilidade apresentaram uma queda de valores, devido ao declínio da temperatura e consequente redução do metabolismo espermático, acompanhada da redução da atividade mecânica da célula. No entanto, mesmo sob condições de anaerobiose parcial e produção de radicais livres, que ocorreu durante o abaixamento de temperatura e que pode afetar a motilidade espermática, a curva de resfriamento utilizada no presente estudo apresentou resultados satisfatórios.

Comparando-se os resultados entre os diferentes diluentes BTS e a água de coco em pó (ACP), eles não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), durante todo o período de abaixamento da temperatura antes da congelação (Gráfico 2). Na análise A5, ocorreu um aumento nas médias em ambos os tratamentos, podendo estar relacionado com a centrifugação que atua como uma capacitação celular induzida através da retirada do plasma seminal, e consequentemente, um aumento no vigor espermático. Constatou-se que o ACP como diluente alternativo, pode substituir comercialmente o BTS, amplamente utilizado em

protocolos de inseminação artificial para a espécie suína, servindo como opção simples, barata e de

fácil obtenção sem comprometer a qualidade espermática.

Gráfico 2. Vigor espermático durante a curva de resfriamento do sêmen suíno conservado nos diluentes BTS e ACP-103<sup>®</sup>, visando a congelação.



A1 = dil.1,30 °C; A2 = 1h, 30 °C; A3 = 25 °C; A4 = 2h, 17 °C; A5 = centrifugação, dil.2 /5 °C; A6 = dil.3 /5 °C

Como pode ser visto no Gráfico 3, a motilidade não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os resultados das seis análises (A1 a A6) em ambos os diluentes. Quanto ao efeito da curva, o ACP apresentou uma menor variabilidade entre os resultados das análises. Nos resultados dos quatro primeiros pontos analisados (A1 a A4) houve uma redução na motilidade em ambos os tratamentos, queda esta explicada pelas alterações de pH e osmolaridade do meio, devido ao consumo do substrato energético e a produção de metabólitos. Em A5 houve um aumento dos valores em ambos os diluentes, que pode ter sido devido à centrifugação e retirada do plasma seminal.

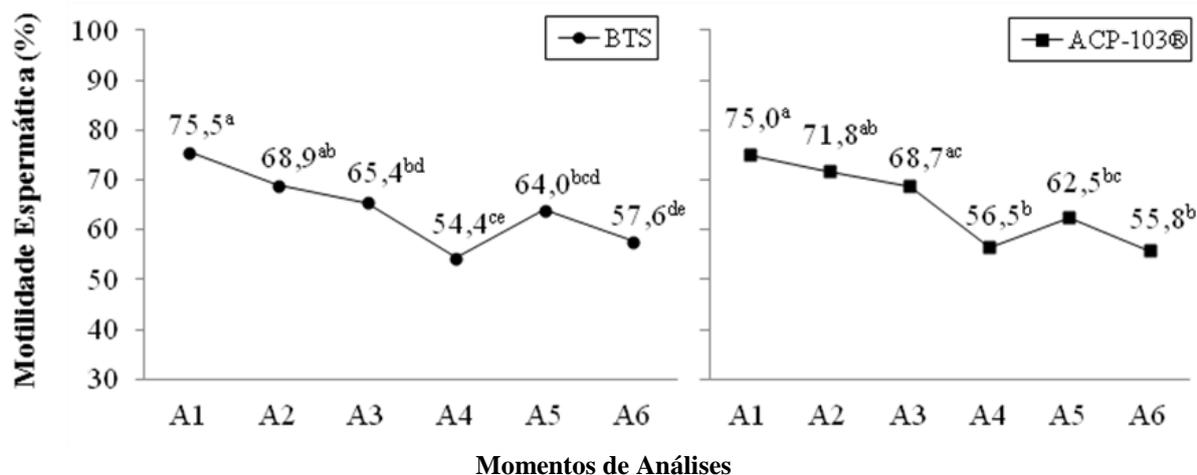
### RESULTADOS APÓS A DESCONGELAÇÃO

Após a descongelação, o BTS apresentou melhores resultados ( $p < 0,05$ ) para as características vigor ( $1,8 \pm 0,9$ ) e motilidade espermática ( $31,4 \pm 22,4$ ), em relação ao diluente ACP ( $1,5 \pm 0,9$  e  $21,3 \pm 18,3$ , respectivamente). Contudo, o sêmen foi congelado com boa qualidade, apresentando uma média de  $2,7 \pm 0,7$  para o vigor, em ambos os diluentes, e para a motilidade de  $57,6 \pm 19,4$  no BTS e  $55,8 \pm 16,5$  no ACP. Por isso é necessário a elaboração de estratégias, como a utilização de novas curvas de

resfriamento, crioprotetores e diluentes, com o intuito de evitar lesões celulares.

Quanto à característica total de espermatozoides vivos / acrossoma intacto e total de células vivas com acrossoma intacto, o BTS e o ACP apresentaram resultados semelhantes, não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1). No entanto, o percentual de células vivas com acrossoma intacto apresentou baixos valores, em ambos os diluentes, após a descongelação.

Quanto à avaliação da funcionabilidade da membrana espermática, avaliada pelo percentual de células reativas ao teste de resistência osmótica, os diluentes testados apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) onde o BTS (28,4%) apresentou maior percentual de membranas funcionais do que o ACP (24,2%). O fato de mais de 70% das células espermáticas não apresentarem membranas funcionais, deve-se a ação da criopreservação em induzir danos físicos nas células, pois este processo promove grande estresse celular. Os espermatozoides com membranas plasmáticas danificadas são considerados incapazes de fertilizar, uma vez que apenas os que apresentam membranas intactas podem sofrer capacitação e reação acrossomal.

Gráfico 3: Motilidade espermática (%) durante a curva de resfriamento do sêmen suíno conservado nos diluentes BTS e ACP-103<sup>®</sup>, visando a congelamento.

Momentos de Análises  
 A1 = dil.1,30 °C; A2 = 1h, 30 °C; A3 = 25 °C; A4 = 2h, 17 °C; A5 = centrifugação, dil.2 /5 °C; A6 = dil.3 /5 °C

Tabela 1. Total de espermatozoides vivos, total de acrossoma intacto e vivos com acrossoma intacto do sêmen suíno analisado no pós-descongelamento (%).

	BTS	ACP-103 <sup>®</sup>
Total espermatozoides vivos	41,1±19,9 <sup>A</sup>	40,5±16,3 <sup>A</sup>
Total de acrossoma intacto	84,8±20,6 <sup>A</sup>	86,3±16,3 <sup>A</sup>
Sptz vivos com acrossoma intacto	37,1±15 <sup>A</sup>	36,9±13 <sup>A</sup>

A, B, C, letras diferentes na mesma linha diferenças significativas (p<0,05).

Apesar da descongelamento estar ligada ao restabelecimento das características celulares, esta pode ocasionar peroxidação lipídica e danos à membrana, decorrentes do rápido aumento da utilização de oxigênio pelo espermatozoide, assim como a ruptura da membrana em razão do excessivo fluxo de água para o interior da célula. Para a obtenção de melhores resultados na criopreservação do sêmen suíno, é necessário uma otimização do protocolo com o intuito de minimizar os danos celulares causados pela congelamento.

Quanto à curva de resfriamento, esta se adequou ao processo de congelamento lenta, mantendo a viabilidade espermática até a congelamento do sêmen. No entanto, a taxa ótima de resfriamento, congelamento e descongelamento podem diferir de acordo com a composição do diluente utilizado. Desta forma, são necessários maiores estudos utilizando o diluente ACP-103 na criopreservação do sêmen suíno para a obtenção de melhores resultados.

Contudo, pode ser visto no presente estudo que embora o BTS tenha apresentado melhores resultados que o ACP em algumas das características analisadas, o ACP ainda assim apresentou resultados aceitáveis para inseminação artificial para a espécie suína. Desta forma, a água de coco em pó pode ser utilizada como diluente

para a criopreservação do sêmen suíno, visto que este mantém a viabilidade espermática de forma que possa vir a ser utilizado na inseminação artificial, além de apresentar fácil manipulação e baixo custo.

### RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PROTEÔMICA

As amostras foram submetidas à eletroforese, onde foram detectados os spots, que representam pontos. Cada ponto representa sequências de aminoácidos que através da análise de identificação consegue-se determinar qual proteína o "spot" representa, os quais foram avaliados e pareados pelo aplicativo PDQuest<sup>®</sup>, com análise estatística baseada na diferença de expressão desses spots entre os dois grupos: grupo de congelabilidade boa e ruim.

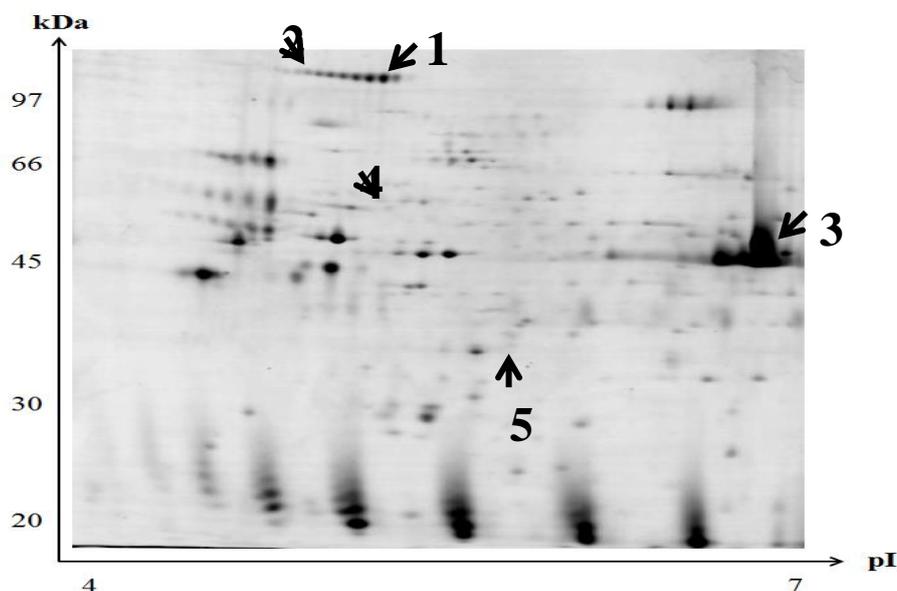
Após descongelamento, o animais foram separados em grupos alta congelabilidade (GFes - vigor  $\geq 2,0$  e motilidade  $\geq 40\%$ ) e de baixa (PFes - vigor  $< 2,0$  e motilidade  $< 40\%$ ) (CASAS et al., 2010). Dos quatorze animais utilizados, seis foram considerados GFes e oito foram PFes. Os animais GFes apresentaram vigor de  $2,2 \pm 0,8$  e motilidade  $41,8 \pm 22,9$ , enquanto que o grupo PFes apresentou  $1,9 \pm 0,6$  e  $26,8 \pm 17,5$ , respectivamente. Os resultados dos parâmetros avaliados após a descongelamento quanto à viabilidade do sêmen neste

estudo confirmam que, mesmo sob as mesmas condições de criopreservação, o grau de alterações produzidas pelo choque térmico não foi o mesmo para ejaculados provenientes de diferentes animais.

Quanto aos totais de *spots* analisados, foi detectada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na intensidade de cinco deles (Figura 1). Os *spots* 1, 2 e 3 foram encontrados em uma intensidade maior nos animais do grupo PFEs (Figura 2), e os *spots* 4 e 5 foram encontrados com uma maior intensidade nos animais do grupo GFEs (figura 3).

Quanto à análise das proteínas de membrana do espermatozoide suíno, foi detectado em média,  $263 \pm 62,2$  *spots* (média de todos *spots* dos 14 géis) por gel (Figura 1). Um total de  $234,2 \pm 54,6$  *spots* (média de *spots* em comum nos 14 géis) foi detectado nos géis dos 14 animais. O grupo GFEs apresentou  $211,8 \pm 64,4$  *spots* em comum entre os 6 animais do grupo, enquanto que o grupo PFEs apresentou  $251 \pm 42,8$  *spots* em comum entre os 8 animais.

Figura 1: Mapa proteico do gel Bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides suínos. As proteínas coradas com Coomassie blue coloidal.



**PFES (CONGELABILIDADE RUIM)**  
**PROTEÍNAS DE MEMBRANA**  
**IDENTIFICADAS: SPOT 1 E 2: FC**  
**FRAGMENT OF IGG BINDING PROTEIN;**  
**SPOT 3: LACTADHERIN PRECURSOR**

O spot 1, com 117,2 kDa e 5,3 pI, foi detectado nos oito animais do PFEs, enquanto que no grupo GFEs, foi detectado nos seis animais (Figura 2A). O spot 2, com 121,4 kDa e 5,0 pI, foi detectado em sete animais do grupo PFEs e em cinco animais do GFEs (Figura 2B). Já o spot 3, com 49,8 kDa e 6,7 pI, foi encontrado em seis animais de cada grupo (Figura 2C).

**GFES (BOA CONGELABILIDADE)**  
**PROTEÍNAS DE MEMBRANA**  
**IDENTIFICADAS: SPOT 4:**  
**ARYLSULFATASE A PRECURSOR;**  
**SPOT 5: F-ACTIN CAPPING PROTEIN**  
**SUBUNIT ALPHA 1**

O spot 4, com 61,4 kDa e 5,3 pI, foi detectado nos oito animais do PFEs, enquanto que no grupo GFEs, foi detectado em quatro animais (Figura 3A). E o spot 5, com 36,8 kDa e 5,8 pI, foi detectado em seis animais do grupo PFEs, enquanto que no grupo GFEs, foi encontrado em cinco animais (Figura 3B).

Figura 2. Intensidades dos *spots* 1, 2 e 3 no mapa bidimensional da membrana dos espermatozoides de suínos, agrupados de acordo com os resultados de vigor e motilidade espermática após a descongelação seminal (PFEs e GFEs).

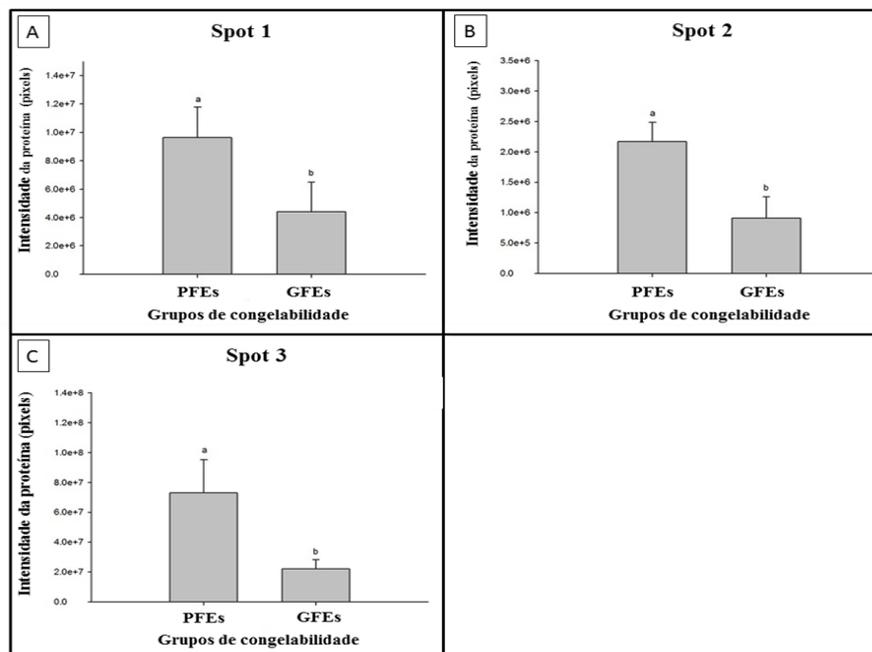
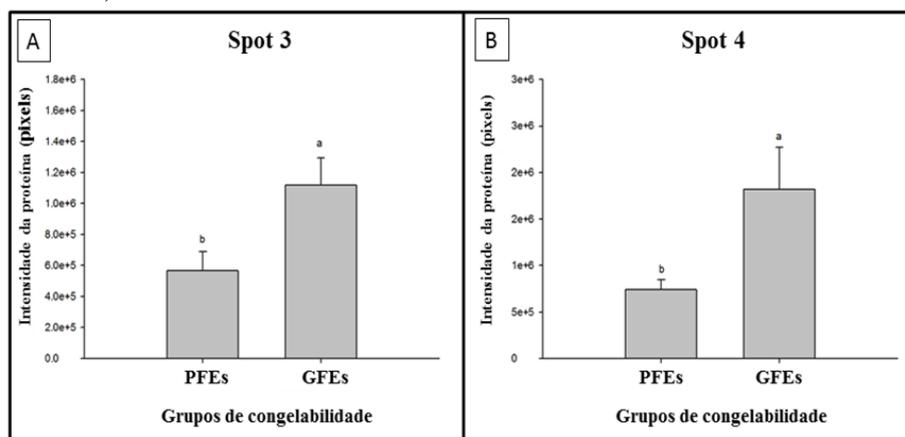


Figura 3. Intensidades dos *spots* 4 e 5 no mapa bidimensional da membrana dos espermatozoides de suínos, agrupados de acordo com os resultados de vigor e motilidade espermática analisados após a descongelação seminal (PFEs e GFEs).



As diferenças quanto à intensidade da expressão de determinadas proteínas podem variar para cada animal, mesmo que estes sejam da mesma espécie. Estas diferentes expressões podem influenciar diretamente na proteção espermática ao processo de criopreservação do sêmen, visto que em estudos anteriores mostraram diferença na intensidade de proteínas e correlacionaram com os resultados da criopreservação do sêmen suíno. Como resultados, observaram que a proteína Acrosina (ACRBP) foi encontrada com maior intensidade em GFEs e a Triose Fosfato Isomerase (TPI) foi mais expressas em PFEs, podendo então estas duas proteínas

atuarem como marcadores de congelabilidade para sêmen suíno.

A capacidade das células espermáticas resistirem ao processo de criopreservação seminal é diferente para cada animal, mesmo sendo da mesma espécie. O uso de marcadores de congelabilidade representa uma vantagem para a criopreservação do sêmen, porque evita utilizar ejaculados que não conseguem resistir ao estresse causado frio. Foram encontrados 5 possíveis marcadores, onde dois destes podem ser utilizados como de boa congelabilidade, pois estão

presentes em ejaculados com viabilidade espermática após a criopreservação.

### PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL

**ALBUMINA:** Modula colesterol, interfere na capacitação espermática e previne estresse;

**NUCLEOBINDINAS:** Modula colesterol, interfere na capacitação espermática;

**OSTEOPONTINA:** Fusão espermatozoide-óvulo e desenvolvimento embrionário inicial;

**ESPERMADESINAS:** Relação inversa com a fertilidade;

**CLUSTERINA:** Previne danos oxidativos;

**FOSFOLIPASE A2:** Reação acrossômica, fusão espermatozoide-óvulo;

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, J.; Ball, B.A. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.87, p.321-337, 2005.
- Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Medina, V.; Davies-Morel, M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, v.21, p.895-902, 2000.
- Bortolozzo, F.P.; Wentz, I.; Bennemann, P.E.; Bernadi, M.L.; Wollmann, E.B.; Ferreira, F.M.; Neto, G.B. *Suínocultura em ação: Inseminação artificial na suínocultura tecnificada*. Copyright, Porto Alegre, Brasil, 85p, 2005.
- Buhr, M.M. et al. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, v.31, p.224-238, 1994.
- Cardoso, R.C.S.; Silva, A.R.; Silva, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.2, n.4, p.257-262, 2005.
- Casas, I.; Sanchoa, S.; Ballesterb, J.; Briza, M.; Pinarta, E.; Bussalleua, E.; Yestea, M.; Fàbregaa, A.; Rodríguez-Gil, J.E.; Boneta, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*, v.74, p.940-50, 2010.
- Collares T., Bongalhardo D.C., Deschamps J.C., Moreira H.L.M. Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction *Animal Reproduction*, v.2, p.11-27, 2005.
- Corrêa, M.N.; Meincke, W.; Lucia Jr., T.; Deschamps, J.C. *Inseminação artificial em suínos*. Copyright. Pelotas, Brasil, 2001, 194p.
- De Leeuw, F.E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v.27, p.171-183, 1990.
- Graham, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Am.: Equine Practice*, v.12, p.131-147, 1996.
- Hess, E.A.; Ludwick, T.M.; Teague, H.S. Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedures. *Journal of Animal Science*, v.19, p.926-931, 1960.
- Jansen, S.; Ekhlesi-Hundrieser, M.; Töpfer-Petersen, E. Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs*, v.168, p.82-92, 2001.
- Jelínková, P.; Manásková, P.; Tichá, M. et al. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.32, p.99-107, 2003.
- Jobim, M.I.M.; Oberst, E.R.; Salbego, C.G. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v.61, p.253-266, 2004.
- Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P.; et al. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.143-172, 2000.
- Johnson, L.H. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. In: International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, 1, 1985, Uppsala. Proceeding... Uppsala: Swedish Univ. Agric. Sci., p.199-222, 1985.
- Keith, S.L. *Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa*. Colorado, 1998. 104 f. Tese (Master of Science). Colorado State University, Fort Collins. 1998.
- Kowalski, R., Glogowski, J., Kucharczyk, D., Goryczko, K., Dobosz, S., Cierieszco, A. Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma of teleosts. *Journal of Fish Biology*, v.63, p.1008-1019, 2003.
- Kraus, M.; Tichá, M.; Zelezná, B. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *J. Reprod. Immunol.*, v.65, p.33-46, 2005.
- Laforest, J.P.; Allard, D. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, p.275-276, 1996.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., Berger, B., Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 2004, v.62, p. 801-808.
- Landsverk, K. Packaging and distribution - their impact on fertility. In: International Conference On Boar Semen Preservation, 4., 1999, Beltsville, Maryland, USA. *Proceedings... Lawrence : Allen, 2000. 280p. p.137-139, 2000.*
- Larsson, K.; Einarsson, S. Influence of boar on the relation ship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.*, v.17, p.74-82, 1976.
- LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here. In: International conference on boar semen preservation. 4., Beltsville, Maryland USA. *Proceedings... Lawrence : Allen, 2000. p.121-128, 2000.*
- Manásková, P.; Balinova, P.; Kraus, M. et al. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.50, p.399-410, 2003.
- Mann, T.; Lutwak-Mann, C. Male reproductive function and semen. *Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology*. Berlin: Springer-Verlag, 1981, 495p.
- Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveita, A.T.D.; Rodrigues, J.L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.

- Medrano, A.; Holt, W.V.; Watson, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.41, n.4, p.246–50, 2009.
- Mileham, A.J., Haven, D., Rohl, J., Van Der Steen, H.A.M. 1997. Porcine semen cryopreservation in a commercial setting. V International Conference on Pig Reproduction. June 2-4, Kerkrade, Netherlands, *Proceedings...* p.128, 1997.
- Miller, D.J.; Winer, M.A.; Ax, R.L. Heparin Biding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, v.42, p.899-915, 1990.
- Moura, A.; Chapman, D.A.; Koc, H. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v.98, p.169-188, 2007.
- Paquignon, M.; Bussiere, J.; Bariteau, F. et al. Effective of frozen boar semen under practical conditions inseminations. *Theriogenology*, v.14, p.217-226, 1980.
- Paquignon, M., Bussiere, J., Bariteau, F. Resultats recents en matiere de technologie de la conservation de la semence de verrat. *J. Rech. Porc. en France*, v.19, p.63-78, 1987.
- Rath, D.; Bathgate, R.; Rodriguez-Martinez, H.; Roca, J.; Strzerek, J.; Waberski, D. Recent advances in boar semen cryopreservation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.66, p.51– 66, 2009.
- Reed, H.C.B. Current use of frozen boar semen - future need of frozen boar semen. In: International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, 1, 1985. Uppsala. *Proceedings...Uppsala: Swedish Univ. Agric. Sci.*, p.225-227, 1985.
- Roca, J.; Hernández, M.; Carvajal, G.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal Animal Science*, v.84, n.10, p.2692–9, 2006.
- Salamon, S. Wilmut, T.; Polge, C. Deep freezing of boar semen I. Effects of diluent composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.26, p.219-230, 1973.
- Sánchez, R.S. Conceito e fundamentos utilizados na inseminação artificial de suínos. *Suínos & Cia. Ano I*, n.2, p.18-22, 2003.
- Saravia, F.; Wallgren, M.; Nagy, S.; Johannisson, A.; Rodrigues-Martines, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, p.1320-1333, 2005.
- Scheid, I.R.; Silveira, P.R.S. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. *Suín Cia*, v.1, n.1, p.25-28, 2002.
- Scheid, I.R.; Wents, I.; Souza, N.M.; Mariano, N.M. Resultados comparativos da inseminação artificial em suínos com sêmen congelado e resfriado. *Comunicado Técnico. EMBRAPA–CNPSA*, Março, 1986, p.1–2.
- Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; McCue, P.M.; Bruemmer, J.E. Principles of cryopreservations. In: *Cooled and frozen Stallion Semen*, v.09, 1999.
- Strzerek, J.; Wysocki, P.; Kordan, W. et al. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod. Biol.*, v.5, p.279-290, 2005.
- Suarez, S.S. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs*, v.168, p.105-112, 2001.
- Thurston, L.M.; Siggins, K.; Mileham, A.J.; Watson, P.F.; Holt, W.V. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters*, v.23, n.4, p.255– 62, 2002.
- Tuli, R.K.; Singh, M.; Matharoo, J.S. Effect of difference extenders on glutamic oxalacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) release from buffalo semen. *Theriogenology*, v.18, p.55-59, 1982.
- Watson, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, n.1, p.135-140, 1996.
- Weitze, K.F. Timing of artificial insemination in breeding herds I. *Proceeding of 3th Conference International of Boar Semen Preservation*, Mariensee, abstract, 1995.
- Woelders, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. *PIGS - Misset*, v.8, p.22-23, 1992.
- Woelders, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, v.19, n.3, p.135-138. 1997.
- Yanagimachi R. Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pigs spermatozoa by detergents and other reagents. *Biol Reprod.*, v.13, n.5, p.519-26, 1994.